

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(1)

(11)Publication number : 2000-105237
(43)Date of publication of application : 11.04.2000

(51)Int.CI.

G01N 33/564
G01N 33/573

(21)Application number : 10-275207
(22)Date of filing : 29.09.1998

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD
(72)Inventor : NISHIDA NAOKO
KOBAYASHI KOJI

(54) SYMPTOM DETERMINATION METHOD OF CHRONIC ARTICULAR RHEUMATISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a symptom determination method of a chronic articular rheumatism capable of accurately measuring a symptom activity of a chronic articular rheumatism in comparison with a conventional method with a simple operation and less danger.

SOLUTION: In the symptom determination method, a blood is collected in a measuring container in which an endotoxine content in the measuring container prior to using is a quantity thereof which does not produce myeloperoxidase from a blood cell, an antigen against a rheumatoid factor is contacted with the blood to form an immune complex comprising the rheumatoid factor and the antigen against it, an emission of myeloperoxidase is induced and an emission quantity of myeloperoxidase is measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-105237

(P2000-105237A)

(43)公開日 平成12年4月11日 (2000.4.11)

(51)IntCl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 01 N 33/564

G 01 N 33/564

B

33/573

33/573

A

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全7頁)

(21)出願番号

特願平10-275207

(71)出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(22)出願日

平成10年9月29日 (1998.9.29)

(72)発明者 西田 尚子

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

(72)発明者 小林 幸司

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

(54)【発明の名称】 慢性関節リウマチの病態判定方法

(57)【要約】

【課題】 慢性関節リウマチの疾患活動性を従来よりも精度良く測定でき、かつ、操作が簡単で危険性が少ない慢性関節リウマチの病態判定方法を提供する。

【解決手段】 使用前の測定容器中のエンドトキシン含量が、血液細胞からミエロペルオキシダーゼを産生しない量とされている測定容器に血液を採取し、該血液とリウマトイド因子に対する抗原を接触させ、リウマトイド因子とそれに対する抗原からなる免疫複合体を形成させて、ミエロペルオキシダーゼの放出を誘導させ、該ミエロペルオキシダーゼの放出量を測定することを特徴とする慢性関節リウマチの病態判定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 使用前の測定容器中のエンドトキシン含量が、血液細胞からミエロペルオキシダーゼを産生しない量とされている測定容器に血液を採取し、該血液とリウマトイド因子に対する抗原を接触させ、リウマトイド因子とそれに対する抗原からなる免疫複合体を形成させて、ミエロペルオキシダーゼの放出を誘導させ、該ミエロペルオキシダーゼの放出量を測定することを特徴とする慢性関節リウマチの病態判定方法。

【請求項2】 使用前の測定容器中のエンドトキシン含量が、測定しようとする液量に等しい水を採取して抽出を行ったときの抽出液中の濃度として、0.5 E U / m l 以下とされていることを特徴とする請求項1記載の慢性関節リウマチの病態判定方法。

【請求項3】 リウマトイド因子に対する抗原の成分が、ウサギガンマグロブリン、ウサギIgG、ヒトガンマグロブリンおよびヒトIgGより成る群から選ばれる少なくとも一種であることを特徴とする請求項1または2記載の慢性関節リウマチの病態判定方法。

【請求項4】 測定容器内が減圧にされていることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項記載の慢性関節リウマチの病態判定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、慢性関節リウマチの病態判定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 日本における慢性関節リウマチ患者は、人口1000人あたり約3人の割合といわれており、特に女性に多いことが知られている。

(1) 定義：リウマチの定義は、「骨、関節、筋肉、腱などの運動器官に痛みとこわばりを訴える疾患」であり、特に慢性関節リウマチ（以下、RAとも示す）は、多発性関節炎を主症状とするが、内臓にも広範に病変を惹起するため、全身性疾患であるとされている。

(2) 病因：リウマチの病因は、リウマトイド因子（以下、RFとも示す）の存在など、自己免疫疾患的な色彩の濃いことが認められているが、これですべてを説明することは困難で、未だ解明されていないのが現状である。この他には、従来から感染説、内分泌異常説、遺伝説などもある。

(3) 診断および治療：リウマチの診断には、アメリカリウマチ学会（ARA）により、1958年に作成された11項目の診断基準が使用されていたが（*Bulletine on the Rheumatic Diseases*、第9巻、175ページ、1958年）、1987年に改訂され、診断基準が次の7項目に削減された（*Arthritis and Rheumatism*、別冊、45ページ、1987年）。

1) 少なくとも1時間以上持続する朝のこわばり（6週間以上）

2) 3個以上の関節の腫脹（6週間以上）

3) 手（WRIST）、中手指関節（MCP）、近位指関節（PIP）

の腫脹（6週間以上）

4) 対称性関節腫脹

5) 手、指のX線像の変化

6) 皮下結節（リウマチ結節）

7) RFの存在

上記7項目のうち、少なくとも4項目の病変が認められれば、リウマチであると診断される。

10) 【0003】特に、これらの基準のうち、リウマチの客観的診断には、RFの測定を行うことが一般的に行われている。すなわち、RFの検出は、RAの診断に際して不可欠となっており、さらにRA以外に多くの関節症状（関節痛、関節炎）を有する他疾患との識別上にも利用されている。しかし、実際には健常人でもRF陽性の人が数へ10%程度存在し、一方リウマチと診断された人もRFの陽性率は40～90%である（検査と技術、第16巻、1442ページ、1988年）。また、血清中にRFが認められる疾患としては、RA以外に、リウマチ近縁疾患やRA以外の膠原病諸疾患（シェーグレン症候群、アジュバント病、膠原病など）で20～40%の陽性率を示し、その他肝疾患（特に肝硬変症、慢性肝炎）や心疾患（特に心筋梗塞発作後、亜急性細菌性心内膜炎）ではともに30～50%の高い陽性率を示す。また、慢性関節リウマチの治療においては、通常各種の非ステロイド性抗炎症剤が最もよく使用されているが、RF値は本薬剤との関係では、ほとんど不变であることが多い。副腎皮質ステロイド剤、金製剤、ペニシラミン剤などの投与ではRFの抗体価減少や陰性化がみられたとの報告もなされている。しかしながら、実際にはRAの活動性病期あるいは治療効果の判定にはRFは用いられず、CRP値や赤沈値をもって指標とされているのが現状である（メディカルテクノロジー、第18巻、第7号、609ページ、1990年）。

20) 【0004】生体の免疫機能は、主に顆粒球、単球、マクロファージ、リンパ球等の白血球によって担われておらず、近年、これらの細胞が産生する種々のサイトカインなどの生理活性物質が生体の免疫機構の恒常性を保つ上で重要であることが解ってきている。リウマチ性疾患においても、リウマチの炎症性とサイトカインとの関係が徐々に明らかになりつつある。特にインターロイキン1（IL-1）および腫瘍壞死因子（TNF）との関係については、その報告も多い（アースリティス・アンド・リウマチズム、第30巻、562ページ、1987年）。これらの報告によれば、特にリウマチを炎症性の疾患の一つとしてとらえ、局所炎症とサイトカインとの関係が論じられている。また、インターロイキン6（IL-6）および顆粒球/単球マクロファージ刺激因子との関連も明らかになりつつある（医学の歩み、第161巻、580ページ、1992年）。この報告も、どちら

30) の報告もなされている。しかしながら、実際にはRAの活動性病期あるいは治療効果の判定にはRFは用いられず、CRP値や赤沈値をもって指標とされているのが現状である（メディカルテクノロジー、第18巻、第7号、609ページ、1990年）。

40) 【0004】生体の免疫機能は、主に顆粒球、単球、マクロファージ、リンパ球等の白血球によって担われておらず、近年、これらの細胞が産生する種々のサイトカインなどの生理活性物質が生体の免疫機構の恒常性を保つ上で重要であることが解ってきている。リウマチ性疾患においても、リウマチの炎症性とサイトカインとの関係が徐々に明らかになりつつある。特にインターロイキン1（IL-1）および腫瘍壞死因子（TNF）との関係については、その報告も多い（アースリティス・アンド・リウマチズム、第30巻、562ページ、1987年）。これらの報告によれば、特にリウマチを炎症性の疾患の一つとしてとらえ、局所炎症とサイトカインとの関係が論じられている。また、インターロイキン6（IL-6）および顆粒球/単球マクロファージ刺激因子との関連も明らかになりつつある（医学の歩み、第161巻、580ページ、1992年）。この報告も、どちら

50) の報告もなされている。しかしながら、実際にはRAの活動性病期あるいは治療効果の判定にはRFは用いられず、CRP値や赤沈値をもって指標とされているのが現状である（メディカルテクノロジー、第18巻、第7号、609ページ、1990年）。

かといえば、リウマチに限らず炎症性の疾患としての関係が論じられている。

【0005】一方、一般に各種の疾患や悪性腫瘍においては、多様な免疫反応によって、生体の免疫担当細胞の機能が抑制されたり、または増強されたりすることが知られている。そこで、これらの細胞の機能を調べることによって、生体の免疫機能を把握することが可能となり、種々の病態の把握や薬剤の投与タイミングの決定など治療の指針となる情報を提供することができる。

【0006】慢性関節リウマチでも、関節局所に集まつた好中球などの白血球が、RAの関節炎にどのように関連しているかについて、骨破壊の面からの研究が多い。Hollanderらは、IgGとRFからなる免疫複合体を貪食した関節液中の好中球から、ライソゾーム酵素が放出され、軟骨が破壊されることを述べている(Ann. Intern. Med., 62巻, 271ページ, 1965年)。また、Zvaiflerらも、滑膜組織に浸潤したリンパ球がRFを産生し、IgGと免疫複合体を形成し、これを好中球が貪食し、ライソゾーム酵素、活性酸素、プロスタグランдинを放出して、骨破壊をもたらすと述べている(Atlas of Arthritis and Allied Conditions, 9th, Lea and Febiger, 417ページ, 1979年)。このように、関節液中の好中球などの白血球が産生する各種酵素類は、関節の軟骨及び骨破壊に主要な役割を演じている。

【0007】特開平9-173336号公報には、インピトロの系において、RFに対する抗原に血液を接触させて、RFとそれに対する抗原からなる免疫複合体を形成させて、ミエロペルオキシダーゼ(以下、MPOとも示す)の放出を誘導させ、該MPOの放出量を測定する慢性関節リウマチの新規病態マーカー測定試薬が開示されている。しかしながら、血液を採取し、特定の測定容器において、MPOの放出量を測定する場合、例えば、注射器のような血液採取器や測定容器中に、もともとグラム陰性菌由来のLPSなどのエンドトキシンが混入している場合に、正確な測定が困難になることが大きな問題であった。エンドトキシンは極微量で、白血球からTNF- α やIL-1等のサイトカインの産生を誘導する。特に、TNF- α には好中球の貪食作用や脱颗粒作用に対して促進作用があることから、MPOの測定結果に悪影響を及ぼすおそれがあった。また、被験者から注射器で血液を採取後、ビベッティング等の用手法の手段で血液を種々の測定容器に移し替える操作が必要であり、これらの操作中に検査従事者が血液に触れ、肝炎、エイズ等様々な感染症に感染する危険性もあった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、慢性関節リウマチの疾患活動性を従来よりも精度良く測定でき、かつ、操作が簡単で危険性が少ない慢性関節リウマチの病態判定方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の発明は、使用前の測定容器中のエンドトキシン含量が、血液細胞からミエロペルオキシダーゼを産生しない量とされている測定容器に血液を採取し、該血液とリウマトイド因子に対する抗原を接触させ、リウマトイド因子とそれに対する抗原からなる免疫複合体を形成させて、ミエロペルオキシダーゼの放出を誘導させ、該ミエロペルオキシダーゼの放出量を測定することを特徴とする慢性関節リウマチの病態判定方法である。請求項2記載の発明は、使用前の測定容器中のエンドトキシン含量が、測定しようとする液量に等しい水を採取して抽出を行ったときの抽出液中の濃度として、0.5EU/ml以下とされていることを特徴とする請求項1記載の慢性関節リウマチの病態判定方法である。請求項3記載の発明は、リウマトイド因子に対する抗原の成分が、ウサギガンマグロブリン、ウサギIgG、ヒトガンマグロブリンおよびヒトIgGより成る群から選ばれる少なくとも一種である請求項1または2記載の慢性関節リウマチの病態判定方法である。請求項4記載の発明は、測定容器内が減圧にされていることを特徴とする請求項1~3いずれか一項記載の慢性関節リウマチの病態判定方法である。

【0010】本発明では、インピトロ系において、RF(リウマトイド因子)に対する抗原に血液を接触させる。RA患者由來の血液のように、血液中にRFが含まれていれば、この操作により、RFとそれに対する抗原から成る免疫複合体が形成される。すなわち、血液中のRFと、RFに対する抗原とを反応させて免疫複合体を形成させる。この反応系に共存している血液中の白血球は、上記免疫複合体のFc部分により、その表面上のレセプターが活性化され、速やかにミエロペルオキシダーゼ等のライソゾーム酵素を放出する。本発明では、このミエロペルオキシダーゼの放出量を測定する。

【0011】上記ミエロペルオキシダーゼは、他のペルオキシダーゼと同様、プロトヘムを補欠分子族として含む酵素であり、主に好中球等骨髓系の白血球から産生されるものであり、他のエラスター、コラゲナーゼに比べて好中球に特異性が高いものである。

【0012】上記リウマトイド因子に対する抗原とは、RFと抗原抗体反応性を有し、免疫複合体を形成するものであれば、特に限定されない。RFに対する抗原としては、抗原の成分にRFとの反応性を獲得せしめたものが挙げられる。上記リウマトイド因子に対する抗原の成分としては、血液中のグロブリン画分が挙げられ、該グロブリン画分は、動物血清から調製されたものでも、細胞融合法によって作成されたモノクローナル抗体でもかない。上記グロブリン画分としては、その産生種は特に限定されず、例えば、ヒトやウサギなどが挙げられ、その種類としては、例えば、ガンマグロブリンやIg

$g\text{G}$ が挙げられる。上記グロブリン画分として、特に、RF検出用の免疫診断薬で実績のある、ウサギガンマグロブリン、ウサギIgG、ヒトガンマグロブリンおよびヒトIgGよりなる群から選ばれる少なくとも一種が好ましい。

【0013】上記抗原の成分にRFとの抗原抗体反応性を獲得せしめる方法としては、通常行われているよう、抗原の成分を熱処理する方法、酵素処理する方法など、RFとの抗原抗体反応性を低下させない方法ならば特に限定されない。

【0014】本発明では、上記のように、全血を用いるため、血液中に含まれる様々な液性因子や細胞の関与が、生体内と同様に働き、より正確に生体内の免疫機能を把握することができる。

【0015】本発明に用いられる測定容器中のエンドトキシン含量は、その使用前において、血液細胞からミエロペルオキシダーゼを産生しない量であることが必要であり、採取血液量と同量のエンドトキシンフリー水を該容器内に採取し、37°Cで1時間の条件で攪拌下で抽出を行った時、該抽出液中のエンドトキシン含量が0.5EU(国際エンドトキシユニット)/ml以下であることが好ましい。なお、上記の抽出を行う際のエンドトキシンフリー水の量は、上記のように測定しようとする採取血液量に全く等しい量である必要は必ずしもなく、抽出が十分になされるなら測定しようとする液量未満であってもよいが、この場合であっても、抽出液中のエンドトキシン含量が0.5EU/ml以下であることが好ましい。

【0016】使用前の測定容器中のエンドトキシン含量が0.5EU/mlを越えると、TNF- α やIL-1等のサイトカインの誘導を引き起こす。特に、TNF- α は好中球の貪食作用や脱顆粒作用に対して促進作用があることから、MPOの放出をも促進する。従って、本発明による慢性関節リウマチの病態判定を正確に行うためには、使用前の測定容器中のエンドトキシン含量がサイトカインの誘導を起さないレベルでなければならない。

【0017】本発明におけるエンドトキシン含量の測定方法は、第13改正日本薬局方解説書「エンドトキシン試験法」における発色合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法であり、例えば市販品のエンドスペице(生化学工業社製)を用いて測定することができる。

【0018】本発明において、エンドトキシンを除去もしくは失活させる方法としては、加熱処理、酸・アルカリ処理による不活化やメンブレンフィルターによる限外濾過法、アニオン性のキトサン系樹脂やエンドトキシンに対して特異的に結合するポリミキシンB、エンドトキシンに対する抗体を固定化した吸着剤による除去方法等、公知の種々の方法を用いることができる。また、RFに対する抗原や血液抗凝固剤について、サイトカイン

の誘導を起さないレベル以下にする際、加熱処理や酸・アルカリ処理による不活化は、それらの活性を変化させる恐れがあり、限外濾過法、吸着剤による除去方法を用いるのが好ましい。また、上記エンドトキシン除去操作に用いる器具、容器は、ガラス製の場合には、250°C、1時間以上の乾熱処理をし、プラスチック製の場合には、0.2M水酸化ナトリウム水溶液に浸し、エンドトキシンフリー水で洗浄し、エンドトキシンを失活させたものを用いる必要がある。また、水は、エンドトキシンフリー水を用いる必要があり、操作環境はクリーンルームなどできる限り二次的なエンドトキシンの汚染を防止できる環境で実施するのが好ましい。

【0019】本発明においては、測定容器に血液をいれる際に、二次的なエンドトキシンの汚染を引き起こし、その結果、生理活性物質の誘導が起り、正確な測定ができなくなる恐れがあることから、測定容器にあらかじめRFに対する抗原を、血液と接触可能な状態に収納しておくのが好ましい。さらに、所定の血液量を採取できるように、測定容器内を減圧にすることがより好ましい。

【0020】本発明で用いる測定容器の形状は、血液とRFに対する抗原との反応を行うことができればどのような形状でもよいが、反応後に血液を別の容器に移しかえなくても遠心分離操作ができる採血管や試験管等のチューブ状のものが望ましい。

【0021】上記測定容器のうち、チューブ状のものとしては、例えば、一端が開口し他端が閉塞してなる有底管体が好ましく、開口部は、栓体によって閉塞可能なものが好ましい。上記有底管体としては、例えば、反応後、上記生理活性物質を測定するための遠心分離操作に好適な試験管状のものがより好ましく、そのサイズとしては、外径が、5~30mm、高さ20~150mm程度が好ましい。

【0022】上記測定容器の材質としては、例えば、プラスチックやガラスが挙げられる。上記プラスチックとしては、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂のいずれもが用いられる。熱可塑性樹脂としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリエチレンテレフタレート、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、スチレン-アクリル酸共重合体、スチレン-メチルメタクリレート共重合体、エチレン-プロピレン共重合体、エチレン-アクリル酸共重合体、エチレン-アクリル酸エステル共重合体等が挙げられる。熱硬化性樹脂としては、例えば、不飽和ポリエステル樹脂、エポキシ樹脂、エポキシアクリレート樹脂等が挙げられる。

【0023】上記測定容器として、チューブ状のものを用いる場合であって、その内部を減圧に維持する場合には、通常、栓体を使用するのがよい。栓体の材質として

は、例えば、ブチルゴム、塩素化ブチルゴム、熱可塑性エラストマー等が挙げられる。

【0024】上記測定容器内の減圧の程度は、測定容器内に常圧の検体血液が吸入されうる程度の圧力であればよく、その圧力は、吸入しようとする検体血液の量によって決められる。すなわち、吸入しようとする検体血液の量が多ければ多いほど減圧の程度を大きくする必要がある。上記測定容器としてチューブ状のものを用いる場合、採取する血液量は、測定容器の容積によって異なるが、通常4~5mlの容積の容器を用いる場合であれば、0.5~2ml程度よい。また、マイクロプレート状のものを用いる場合の採取血液量は、50μl~2ml程度よい。

【0025】上記測定容器内には、必要に応じて、血液が凝固しないように血液抗凝固剤を収納してもよい。上記血液抗凝固剤としては、ヘパリン化合物、クエン酸化合物、シウ酸化合物などが挙げられる。ただし、ミエロペルオキシダーゼの放出は、細胞の生化学的反応であるため、血液や培地中のカルシウムイオン、マグネシウムイオン等をキレートしないヘパリン化合物を用いるのがより好ましい。上記ヘパリンナトリウムの該容器中の収納量としては、該容器に血液が収納された時に、その血液中の濃度が低くなると血液凝固の懼れがあり、高くなると細胞に不測の活性化や不活性化を起こす懼れがあるので、4~50u/mlが好ましく、より好ましくは8~20u/mlである。

【0026】上記測定容器の製造方法としては、内部を減圧にすることが可能である容器に、上記RFに対する抗原及び血液抗凝固剤を加え、容器を所定の減圧状態にした後、上記容器に栓をすることによって製造する方法が挙げられる。また、上記測定容器は、エンドトキシンや雑菌の混入をさけるため、できる限りクリーンな環境で製造されるのが好ましく、また、可能であれば製造後に公知の滅菌処理を施すのが好ましい。

【0027】本発明において、RFとそれに対する抗原からなる免疫複合体を形成させて、ミエロペルオキシダーゼの放出を誘導させる際の反応は、プレートや試験管等の容器中で行われるが、その際、プレートや試験管などを振とう機や回転培養器を用いて混和することが、ミエロペルオキシダーゼの放出には望ましく、個々の血液サンプルの慢性関節リウマチ特異の細胞性免疫能を生体に近い状態で把握し易くする。反応温度は、通常37°C付近の温度条件下で行われるが、15°Cから42°Cの範囲でも行い得る。

【0028】本発明において、放出されたミエロペルオキシダーゼの測定は、各種の酵素免疫測定法、酵素測定法、比色定量法もしくは化学発光法等で行うことができる。

【0029】次に本発明の一実施様態として、内部を減圧にすることが可能である測定容器に、上記RFに対す

る抗原及び血液抗凝固剤を収納して製造した測定容器を用いて、慢性関節リウマチの病態を判定する方法を述べる。なお、RFに対する抗原は、グロブリン画分、例えば、ヒトガンマグロブリンを熱変性させてRFとの反応性を獲得せしめたものである。まず、血管または採血容器と上記測定容器とを、例えばマルチブル注射針（両端が捺針でき、かつ連通されている採血針）を用いて連通させ、上記測定容器中にリウマチ患者の血液を吸入させる。これにより、熱変性グロブリンとRFとが反応して免疫複合体が形成される。ついで、反応溶液中の免疫複合体を貪食しようとした白血球表面に、免疫複合体が強く付着し、ミエロペルオキシダーゼが放出される。このミエロペルオキシダーゼの量を上記の方法により測定することによって、慢性関節リウマチによる炎症の程度を把握することができる。

【0030】

【実施例】以下、本発明の実施例及び比較例を挙げることにより、本発明をさらに詳細に説明する。本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、ガラス製の器具、容器は、250°Cで2時間の乾熱処理を行い、プラスチック製の器具、容器は市販のエンドトキシンフリーのものを用いるか、予め、0.2M水酸化ナトリウム水溶液に一晩浸してエンドトキシンを失活させ、十分にエンドトキシンフリー水で洗浄したものを用いた。また、操作はクリーンベンチ内で行った。

【0031】（実施例1）測定容器としてエンドトキシンフリー（抽出液中のエンドトキシン含量が0.5EU/ml未満）のポリエチレンテレフタレート製の5mlの採血管（12.6φ×75mm）（積水化学社製）を用いた。この測定容器にウサギIgG（Purified Rabbit IgG, Cappel Research Products社製、19.0mg/ml）を35°Cで2時間インキュベートすることにより、グロブリンを熱変性してグロブリンにRFとの抗原性を獲得させた熱変性グロブリン250μlを添加した。次いで、管径に合うブチルゴム製の栓で開口部を密栓した。多発性関節炎を自然発症したMRL/lpr/lprマウス（以下MRL/lprマウスと略す、16週齢、雄性、日本SLC社）をクリーンな環境下で飼育した。17週齢、19週齢、21週齢、23週齢のときにランダムに5匹を選択し、各々のマウスから、ヘパリン採血した。この血液を採取したシリジンの針を上記のグロブリンを添加した測定容器の栓体に突き刺し、各々の測定容器に血液を約0.5mlずつ添加した。また、ブランクとして、熱変性グロブリンの代わりにグロブリン希釈緩衝液（50mMグリシン-NaOH（pH8.40））250μlを添加した測定容器を用いて同様の操作を行った。これを、37°Cで3時間インキュベートし、反応終了後、4°C、1600Gで10分間遠心分離して、上清を採取した。ここで得られた、上清を検体として、以下の方法を

用いた。この測定容器にウサギIgG（Purified Rabbit IgG, Cappel Research Products社製、19.0mg/ml）を35°Cで2時間インキュベートすることにより、グロブリンを熱変性してグロブリンにRFとの抗原性を獲得させた熱変性グロブリン250μlを添加した。次いで、管径に合うブチルゴム製の栓で開口部を密栓した。多発性関節炎を自然発症したMRL/lpr/lprマウス（以下MRL/lprマウスと略す、16週齢、雄性、日本SLC社）をクリーンな環境下で飼育した。17週齢、19週齢、21週齢、23週齢のときにランダムに5匹を選択し、各々のマウスから、ヘパリン採血した。この血液を採取したシリジンの針を上記のグロブリンを添加した測定容器の栓体に突き刺し、各々の測定容器に血液を約0.5mlずつ添加した。また、ブランクとして、熱変性グロブリンの代わりにグロブリン希釈緩衝液（50mMグリシン-NaOH（pH8.40））250μlを添加した測定容器を用いて同様の操作を行った。これを、37°Cで3時間インキュベートし、反応終了後、4°C、1600Gで10分間遠心分離して、上清を採取した。ここで得られた、上清を検体として、以下の方法を

用いてミエロペルオキシダーゼ(MPO)量の測定を行った。まず、0.1M McCilvine buffer (pH 5.7)にDA-67(10-(Carboxymethylaminocarbonyl)-3,7-bis(dimethylamino)-phenothiazine sodium salt、和光純薬、試葉特級)を0.1mMになるように溶解したもの99mlに、2% H₂O₂を1ml添加して、MPO測定用基質溶液を調製した。上記MPO測定用基質溶液2mlを石英セル中で、37°Cでインキュベートしながら上記検体10μlを添加し、5分後に、666nmでの吸光度(以下、OD 666と示す。)を測定した。そして、検体の上清を用いて得られたOD 666の測定値から、ブランクの上清を用いて得られたOD 666の測定値を差し引いた値をその検体の反応量とした。上記のようにして得られた検体の上清の代わりに、既知濃度のMPOのPBS溶液を用いて、上記の操作により予め検量線を作成しておき、得られた検体の反応量を上記の検量線に当てはめて、検体中のMPO量を算出した。

【0032】なお、使用前の測定容器中のエンドトキシ*

【表1】

マウス No.		関節炎の重篤度				ミエロペルオキシダーゼ量 (ng/ml)			
		17 週齢	19 週齢	21 週齢	23 週齢	17 週齢	19 週齢	21 週齢	23 週齢
実 施 例 1	A1	0	+1	+2	+2	0.1	50.5	87.5	90.3
	A2	0	+1	+2	+3	0.2	32.9	95.3	150.7
	A3	0	+2	+2	+3	0.1	68.4	78.5	135.6
	A4	0	+1	+1	+2	0.3	40.7	55.2	81.5
	A5	0	+1	+3	+3	0.1	45.2	120.7	140.6
比 較 例 1	B1	0	+1	+2	+3	0.3	60.3	137.2	82.4
	B2	0	+1	+1	+3	-5.1	29.4	110.7	99.0
	B3	0	+2	+2	+3	10.5	40.6	62.8	117.5
	B4	0	+1	+1	+2	1.0	80.9	59.5	90.6
	B5	0	+2	+3	+3	4.6	48.6	100.6	180.2

【0034】(比較例1) 使用前の測定容器としてエンドトキシンフリー(抽出液中のエンドトキシン含量が0.5EU/ml未満)規格のないポリエチレンテレフタレート製の5mlの採血管(12.6φ×75mm)(積水化学社製)を用いた以外は、実施例1と同様にして試験した。なお、使用前の測定容器中のエンドトキシン含量を求めるために、使用した測定容器と同一Lotの採血管を用いて、実施例1と同様にして測定した。その結果、試験した測定容器のすべてにおいて0.5EU/mlよりも高いエンドトキシンが測定された。結果を表1及び図2に示した。

【0035】表1及び図1・2から明らかなように、実施例1では、MRL/lprマウスの自然発症性のリウマチ性多発性関節炎の症状の重篤度の推移と、MPO放出量の推移は良い一致を示した。これに対し、比較例1では、症状の重篤度とMPO放出量の推移は必ずしも一致せ

*ン含量を求めるために、使用した測定容器と同一Lotの採血管を用いて、以下のように測定した。エンドトキシンフリー水(大塚製薬社製)を約1mlを上記測定容器に採取し、1時間、37°Cで攪拌し、エンドトキシンを抽出した。つぎに、この抽出液中のエンドトキシン含量をエンドスペシーエSS50Mセット(生化学工業社製)を用いて、マイクロプレート法、赤色測定法にて測定した。その結果、試験した測定容器のすべてにおいて0.5EU/mlよりも低いエンドトキシン量であった。各々のMRL/lprマウスの自然発症性の慢性リウマチ関節炎の重篤度を四肢の指関節の変形度および尻尾関節の変形度などから総合的に判断して、以下の0~+3までに分類した。

0 : 外見上、正常マウスと変化なし。

+1 : 尻尾がやや変形している。

+2 : 尻尾がかなり変形している。

+3 : 手足の爪がはがれ、出血のあとがある。

結果を表1及び図1に示した。

【0033】

ず、また、ブランクの上清を用いて得られたOD 666の測定値も高く、免疫複合体が存在しなくてもMPOの放出が認められた。

【0036】(実施例2) 実施例1で用いたと同じエンドトキシンフリーの測定容器に、実施例1と同一の熱変性グロブリンを添加した。MRL/lprマウス(16週齢、雄性、日本SLC社)をクリーンな環境下で飼育した。19週齢および23週齢のときにランダムに8匹を選択し、各々のマウスからヘパリン採血し、約12mlプールした。この血液をプールしたシリソジの針を上記のグロブリンを添加した測定容器の栓体に突き刺し、各々の測定容器に血液を約0.5mlずつ添加した。また、ブランクとして、熱変性グロブリンの代わりにグロブリン希釈緩衝液(50mMグリシン-NaOH(pH 8.40))250μlを添加した測定容器を用いて同様の操作を行った。以下、実施例1と同様にしてMPO

量の測定を行い、同時再現性を評価した。結果を表2に示した。なお、使用前の測定容器中のエンドトキシン含量を求めるために、使用した測定容器と同一Loftの採血管を用いて、実施例1と同様にして測定した。その結果

* 果、試験した測定容器の全てにおいて、0.5 EU/m¹よりも低いエンドトキシン量であった。

【0037】

【表2】

ミエロペルオキシダーゼ (ng/ml)				
マウス週齢	19週齢		23週齢	
試験回数	実施例2	比較例2	実施例2	比較例2
1	54.5	81.5	120.7	78.4
2	49.7	70.9	138.6	118.0
3	51.6	65.0	113.0	150.6
4	53.6	30.6	125.3	90.6
5	48.2	63.2	120.4	100.7
平均値	51.5	62.2	123.6	107.7
標準偏差	2.3	17.1	8.5	25.1
変動係数 (%)	4.5	27.5	6.9	23.3

【0038】(比較例2) 使用前の測定容器としてエンドトキシンフリー(抽出液中のエンドトキシン含量が0.5 EU/ml未満)規格のないポリエチレンレバターレート製の5mlの採血管(12.6φ×75mm)(積水化学社製)を用いた以外は、実施例2と同様にして試験した。用いた血液は、実施例2で用いたと同じ血液を用い、同時再現性を評価した。結果を表2に示した。なお、使用前の測定容器中のエンドトキシン含量を求めるために、使用した測定容器と同一Loftの採血管を用いて、実施例1と同様にして測定した。その結果、試験した測定容器のすべてにおいて0.5 EU/mlよりも高いエンドトキシンが測定された。

【0039】表2から明らかのように、実施例2では、良好な同時再現性が得られたが、比較例2では、同時再現性が悪かった。また、比較例2では、ブランクの上清を用いて得られたOD666の測定値も高く、免疫複合体が存在しなくてもMPOの放出が認められた。

【0040】

【発明の効果】本発明では、エンドトキシン含量が管理

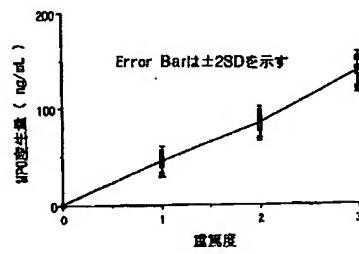
された測定容器を用いるため、細胞の不要な活性化または活性低下が惹起される問題もなく、リウマトイド因子に対する抗原と、患者血液中のリウマトイド因子が結合し、形成された免疫複合体が好中球等の白血球を活性化させて、放出されるミエロペルオキシダーゼを高い信頼性をもって、正確に測定することができる。また、被験者から血液を採血後、ビベッティングなどの手段で血液を種々の反応容器に移し替えたり、細胞分離、細胞培養等の操作を必要としないため、検査従事者は、肝炎、 AIDSなどの種々の感染症に感染する危険性もほとんどない。そのため、本方法は、RFとRFに対する抗原の免疫複合体による血液細胞からのMPO放出量を指標とした慢性関節リウマチの病態判定を、従来よりも、精度良く、安全かつ簡単に行うこと可能にする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1における関節炎の重篤度とMPO産生量との関係を示した図

【図2】 比較例1における関節炎の重篤度とMPO産生量との関係を示した図

【図1】



【図2】

